

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657151

研究課題名(和文) 三次元足場構造そのものによる細胞分化の機構解明

研究課題名(英文) Analysis of cell differentiation stimulated by the macroscopic structure of cell culture substratum

研究代表者

垣内 康孝 (KAKIUCHI, Yasutaka)

お茶の水女子大学・サイエンス&エデュケーションセンター・准教授

研究者番号：90396268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：自己組織化能を持つペプチド水素ゲルであるRADA16が濃度依存的に少なくとも3タイプの三次元構造体(Type I-III)を形成した。ヒト白血病細胞HL-60をRADA16下で培養したところtype I構造を形成する濃度下(0.01%)でHL-60が単球/マクロファージへと分化した。ゲル巨視的構造を破壊すると分化誘導は消失した。即ち、誘導能はRADA16の巨視的構造に依存した。誘導を受けたHL-60では細胞内コレステロールが通常の10倍程度に蓄積した。コレステロール添加実験により高濃度のコレステロールが分化誘導の鍵である事が示された。ゲル構造による分化誘導は真正粘菌でも検証した。

研究成果の概要(英文)：The physiological activities of the macroscopic structure of self-assembling peptide hydrogel, RADA16, were studied. RADA16 exhibited three distinct assembly patterns depending on its concentration, and one of these assemblies (formed with 0.01% RADA16) was capable of inducing differentiation of human leukemia HL-60 cells into monocytes/macrophages. This activity was reduced by destroying the 3D structure of the assembly, suggesting that the assembly intrinsically retained the ability to induce cell differentiation. When cultured in the RADA16 scaffold, HL-60 cells accumulated intracellular cholesterol about 10 times more than normally cultured cells. Both the RADA16 culture and cholesterol loading brought about similar gene expression profiles. These results showed that HL-60 cells can sense the physical properties of the RADA16 scaffold through a mechanism that may involve intracellular pathways of cholesterol synthesis and/or transport.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞 分化 三次元培養 ヒトHL60細胞 血球分化 真正粘菌変形体 フラグメント化

1. 研究開始当初の背景

細胞は二次元環境(平坦なシャーレ)で培養するよりも、三次元環境で培養するほうが生体内本来の性質に近い特性を発揮することが様々な細胞種で示されつつあった(1)。このことは細胞を再生医療等に利用するうえで極めて重要な特性であり、このことを背景として、三次元培養の基質となる様々な新規素材、新規培養方法が開発されつつあった(2)。さらに、三次元培養下の細胞は三次元基質の剛性やトポロジー等、三次元基質の物理的特性に影響されることも報告されていた(3)。

しかし、細胞にとって三次元環境がなぜ良いのか、あるいは二次元環境に対する三次元環境の本質的な違いは何か、三次元環境の何がどのように細胞に伝わるのか、といった問いに対しては依然として答えられていない状況にあった。今後、三次元培養の利点を最大限利用した最良の三次元培養基質を開発するうえでも、「三次元であることの意義」を精密に理解する必要があると考えた。

2. 研究の目的

三次元培養基質として用いられる材料のひとつに RADA-16 と呼ばれるペプチド (RADA を 4 個連結した 16-mer ペプチド) があり、カチオン存在下で自己組織的にゲルを形成する。応募者は、RADA-16 を用いた三次元培養により、ヒト前骨髄性白血球細胞 HL-60 が自発的に細胞分化する現象を見だし、上述の研究課題に迫る有力なツールになると考えた。

すなわち、上記の現象を突破口として、(1) RADA-16 の巨視的構造を改変することで三次元培養に関与する基質三次元構造の特徴を明らかにする、(2) このことにより分化を示した細胞の遺伝子発現プロファイルを解析することで三次元による「構造刺激」を受容する分子の実体を明らかにする、(3) 三次元基質による細胞分化の端緒となる初期応答機構を明らかにする、ことを本研究の目的とした。また、三次元基質の生理活性および巨視的三次元構造情報を受容する普遍的な細胞応答機構を分析するため、真正粘菌変形体 *Physarum polycephalum* を用いた実験系を立ち上げ、変形体の形態形成現象(4, 5)を指標とした分析を行った。

3. 研究の方法

(1) RADA ゲルの巨視的構造の改変および解析

RADA-16 による三次元培養基質を通常用いられる濃度の数分の 1~数百分の 1 程度に変えた。さらに、RADA-16 と化学組成が同一でペプチド長の異なる RADA-8 (RADA を 2 個連結した 8-mer ペプチド) を様々な比で添加する、等により、化学組成は同一ながら様々なマクロ構造を持つゲルを作成した。RADA-16 単独または RADA-16 と RADA-8 の混成ゲルの

巨視的構造を光学顕微鏡による解析(2次元フーリエ解析)、レーザー回折粒状解析等により解析した。

(2) 培養細胞の分化性状解析および遺伝子発現プロファイル解析

細胞はヒト前骨髄性白血球細胞 HL-60 を用いた。通常の培養方法あるいは上述の RADA ゲルを用いた方法で 4 日間培養した HL-60 を解析した。具体的には、(a) 位相差顕微鏡による細胞形状観察、CD-14 表面抗原を検出する蛍光標識抗体で染色した細胞の蛍光顕微鏡観察、(b) フローサイトメトリー法による細胞粒径および側方散乱光の 2 次元分析、(3) リアルタイム PCR 法による遺伝子発現レベル分析を行った。(3) については、(1) および (2) の方法により HL-60 が単球/マクロファージ様の分化を示している事を確認した上で、CD38、CD14、CD34、CD68、CD11b、c-myc、MMP9、MMP25、Rho、b-actin、および b-tubulin 遺伝子について解析した。さらに、細胞分化へのコレステロールの関与があるとして、ABCA1、ABCG1、CYP7A、raftlin、LYN、npc1、および npc2 遺伝子について解析した。

(3) 細胞内コレステロール定量およびコレステロール添加

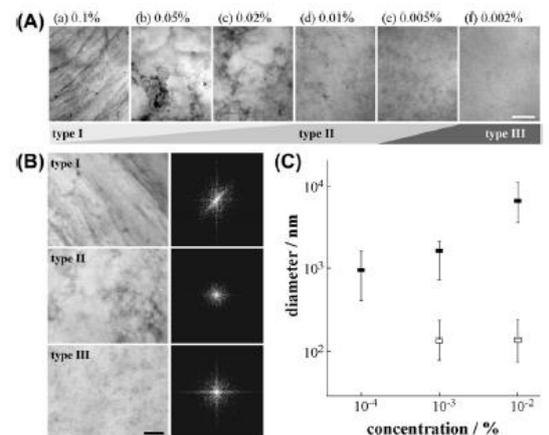
細胞内コレステロール量は市販の定量キットを用い、蛍光イメージアナライザを用いて定量した。コレステロールはシクロデキストリンを用いて細胞に投与し 15 時間後に遺伝子発現レベルを解析した。

(4) 真正粘菌変形体 *Physarum polycephalum* の形態形成現象を指標とした解析

真正粘菌 *Physarum* の新規形態形成現象であるフラグメント化現象(4, 5)を利用して *Physarum* に対する RADA 三次元基質の影響を解析した。ペルチェ素子により温度制御を行うフラグメント化誘導装置を自作し、フラグメント化率、フラグメントサイズ等の RADA ゲル濃度依存性を解析した。

4. 研究成果

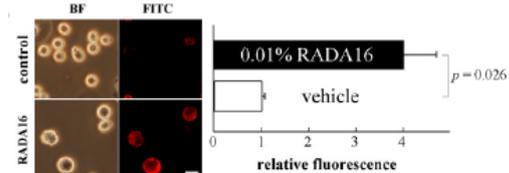
(1) RADA ゲルの巨視的構造



(BBRC 433, 298-304 (2013)より引用)

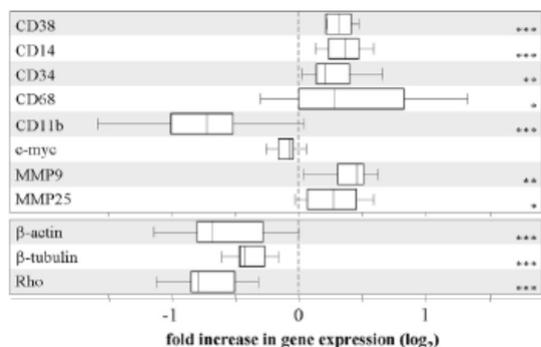
RADA-16 は濃度によりタイプ I ~ III の 3 種類の巨視的構造を示した。タイプ I は厚みがほぼ均一な膜状、タイプ II は不明瞭で多様な構造を持ちタイプ III は均一に分散した粒状を示した。これらの構造は 2 次元フーリエ解析でも区別された。これらの構造のうち HL-60 の分化誘導能を示すのは 0.01% 付近の RADA-16 でありタイプ II 構造が優占的であった。

(2) 培養細胞の分化性状解析および遺伝子発現プロファイル解析



(BBRC 433, 298-304 (2013) より引用)

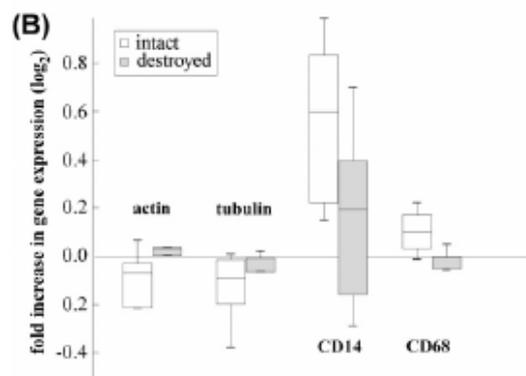
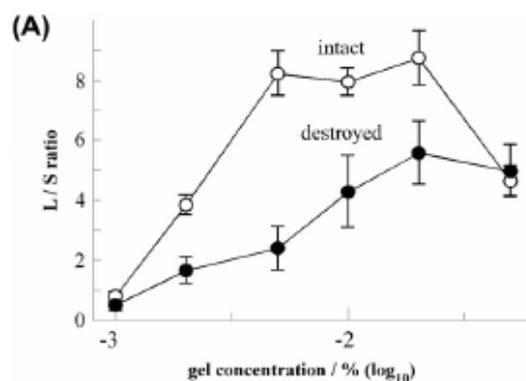
単球/マクロファージマーカーである CD-14 表面抗原を FITC 蛍光標識抗体で染色し、蛍光顕微鏡観察により定量した。このことから HL-60 細胞を RADA-16 ゲルで培養したことにより単球/マクロファージ様細胞が分化したことを確認した。このことは分化関連遺伝子の発現レベル分析によりさらに解析した。



(BBRC 433, 298-304 (2013) より引用)

細胞分化傾向をより詳細に分析するため、単球/マクロファージ分化に関連する遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR 解析した。典型的な単球/マクロファージ分化関連遺伝子である CD14、CD38、CD68、MMP-9、および MMP-25 の発現レベルが有意に上昇しており、表面抗原の抗体染色に基づく予想を支持した。一方、CD34 および CD11b の結果は予想を支持しなかった。RADA-16 により分化誘導された細胞が典型的な細胞種ではない可能性、或いは複数の異なる細胞種群が分化誘導されてリアルタイム PCR 解析ではそれら全細胞種群の平均が得られた可能性等が考えられ

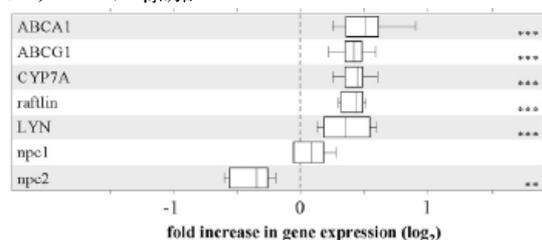
るが、詳細は明らかでない。



(BBRC 433, 298-304 (2013) より引用)

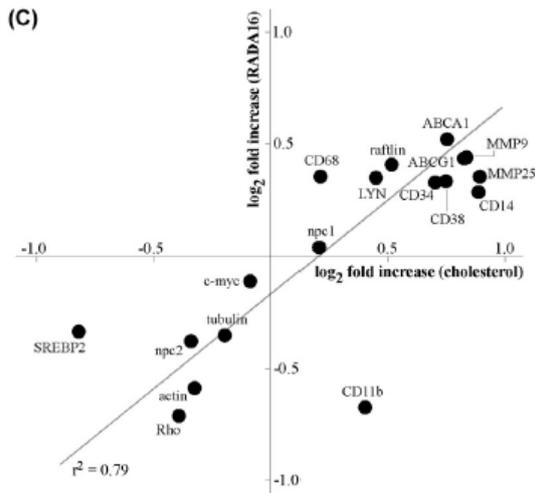
RADA-16 ゲルの巨視的構造を機械的に破壊することにより HL-60 細胞の分化誘導は抑制され、このことから RADA-16 による HL-60 の単球/マクロファージへの分化は、少なくとも部分的に RADA-16 ゲルの巨視的構造で誘導されることを、フローサイトメトリーによる側方散乱光量 (図上) および遺伝子発現レベル (図下) により確認した。

(3) 細胞内コレステロール定量およびコレステロール添加



(BBRC 433, 298-304 (2013) より引用)

コレステロールの生成および輸送に関連する遺伝子群の発現レベルを解析した。生成および輸送に関連する多くの遺伝子群が発現上昇したが、細胞内コレステロールの輸送に関連する npc2 遺伝子の発現レベルが有意に減少した。このことは endosome 内のコレステロール上昇をもたらす報告がある (6) ことから細胞内コレステロールレベルを測定したところ、通常の方法で培養した HL-60 と比較して凡そ 10 倍に増加していることを確認した。



(BBRC 433, 298-304 (2013)より引用)

コレステロールは単球/マクロファージ分化を誘導する化学刺激のひとつである(7)。RADA-16を用いた三次元培養による単球/マクロファージ様細胞分化と細胞内コレステロール蓄積の因果関係を明らかにするため細胞へのコレステロール投与実験を行った。コレステロールの投与により得られた遺伝子発現変動は、RADA-16で三次元培養した際のそれとほぼ類似した結果となった。三次元基質の巨視的構造による構造刺激が細胞内コレステロールの蓄積をもたらし、このことにより単球/マクロファージへの分化が誘導される可能性が示唆された。

(4) 真正粘菌変形体 *Physarum polycephalum* の形態形成現象を指標とした解析

真正粘菌 *Physarum* のフラグメント化は実施者が見いだした *Physarum* の新規形態形成現象である(4,5)。低温刺激あるいは光照射により誘導され、*Physarum* で従来より知られる形態形成である胞子形成や皮体形成と比較して短時間(凡そ5時間)で形態形成を完了することから *Physarum* の情報伝達機構を解析する好適な現象である。まず、フラグメント化を利用して *Physarum* に対する RADA 三次元基質の影響を解析するための実験系を立ち上げた。ペルチェ素子により温度制御を行うフラグメント化誘導装置をアルミブロックの加工により自作した。フラグメント化率、フラグメントサイズ等の RADA ゲル濃度依存性を解析した。変形体を置いた RADA-16 ゲル基質の濃度により温度フラグメント化率が異なるが、HL-60 で得られた濃度依存性とは必ずしも一致しないことを確認した。

<引用文献>

1. F. Pampaloni, E.G. Reynaud, E.H.K. Stelzer, The third dimensions bridges the gap between cell culture and live tissue, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 839-845.
2. J. Lee, M.J. Cuddihy, N.A. Kotov, Three-dimensional cell culture matrices: state of the art, *Tissue Eng. Part B* 14

(2008) 61-86.

3. M.M. Stevens, J.H. George, Exploring and engineering the cell surface interface, *Science* 310 (2005) 1135-1138.
4. Y. Kakiuchi, T. Ueda, Fragmentation of the plasmodium into equally sized pieces by low temperature in the true slime mold *Physarum polycephalum*: a new morphogenesis, *Protoplasma* 206 (1999) 131-136.
5. Y. Kakiuchi, T. Takahashi, A. Murakami, T. Ueda, Light irradiation induces fragmentation of the plasmodium, a novel photomorphogenesis in the true slime mold *Physarum polycephalum*: action spectra and evidence for involvement of the phytochrome, *Photochemistry and Photobiology* 73 (2001) 324-329.
6. R.E. Infante, M.L. Wang, A. Radhakrishnan, et al., NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 15287-15292.
7. J.M. Hayden, L. Brachova, K. Higgins, et al., Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 26-35.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Yasutaka Kakiuchi, Noritaka Hirohashi, and Kimiko Murakami-Murofushi, The Macroscopic Structure of RADA16 Peptide Hydrogel Stimulates Monocyte/Macrophage Differentiation in HL60 Cells via Cholesterol Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 433, p298-304 (2013) (doi:10.1016/j.bbrc.2013.02.105) 査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣内 康孝 (KAKIUCHI, Yasutaka)
お茶の水女子大学・サイエンス&エデュケーションセンター・特任准教授
研究者番号: 90396268

(2) 研究分担者

岡村 浩司 (OKAMURA, Kouji)
独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部組織工学研究室・室長
研究者番号: 80456194

(3) 連携研究者
無し